

Premiers résultats de la culture "in vitro" d'ovules non fécondés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.)

P. Pallares

Laboratoire de Cytogénétique du G.E.R.D.A.T., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

RÉSUMÉ

On a tenté l'haploïdisation par gynogénèse de l'espèce tétraploïde cultivée de cotonnier *G. hirsutum*. Après 2 à 3 mois de culture, des embryons à divers stades de déve-

loppement ont été observés dans les cavités ovulaires. Des meristèmes et des néoformations apparaissent dans le même temps dans le cal issu des téguments externes de l'ovule.

MOTS CLÉS : culture in vitro, *Gossypium hirsutum*, ovules, gynogénèse, embryogénèse somatique.

INTRODUCTION

Le genre *Gossypium* comprend 33 espèces diploïdes ($2n = 2 \times = 26$ chromosomes) réparties en 7 génomes, de A à G, et 4 espèces tétraploïdes ($2n = 4 \times = 52$ chromosomes) résultant de l'hybridation de deux espèces des génomes A et D, suivie du doublement spontané du stock chromosomique de l'hybride.

Sur les 4 seules espèces cultivées, 2 sont diploïdes et 2 tétraploïdes. L'un des objectifs de la sélection est d'incorporer aux variétés cultivées des caractères intéressants présents chez les espèces sauvages par le biais de l'hybridation interspécifique. Mais celle-ci n'est pas toujours réalisable, du fait de l'éloignement des génomes qui conditionne un mauvais appariement chromosomique, ou de la différence de niveau de ploïdie, des barrières d'incompatibilité se manifestant alors entre embryon, albumen et tissus maternels. De nombreux auteurs ont donc tenté de surmonter ces obstacles par la culture *in vitro* d'ovules ou d'embryons ainsi soustraits à un environnement défavorable.

Les premières réussites ont été obtenues dans des cas simples d'autofécondation (JOSHI, 1960; BEASLEY, 1971; JOSHI et JOSHI, 1972; EID *et al.*, 1973; BEASLEY et TING, 1973 et 1974; STEWART et HSU, 1977). Plus récemment, les recherches se sont étendues à des cas plus complexes d'hybridations interspécifiques (STEWART et HSU, 1978; GILL et BAJAJ, 1984 a et b).

Parallèlement, les travaux sont aussi conduits dans d'autres domaines, notamment l'embryogénèse soma-

tique (KATTERMANN *et al.*, 1977; PRICE *et al.*, 1977; WILLIAMS, 1978; SMITH et PRICE, 1979; HSU et STEWART, 1980; PRICE et SMITH, 1980; FINER et SMITH, 1982 et 1984; DAVIDONIS et HAMILTON, 1983) ou les méthodes d'haploïdisation par androgénèse (BARROW *et al.*, 1978; HSI et WU, 1978) ou gynogénèse, cette dernière voie n'ayant pas encore fait l'objet de publication.

Si ces dernières méthodes étaient mises au point, elles permettraient un gain de temps appréciable dans les schémas d'amélioration, par la possibilité de fixer rapidement les lignées à l'état homozygote après doublement chromosomique. La voie de l'androgénèse a été jusqu'ici la plus explorée, sans doute du fait qu'une anthère contient un plus grand nombre d'embryons potentiels (en théorie, un par microspore), et donc plus de chances de succès et de variabilité. Les travaux existants ne font pourtant pas encore état de la régénération de plantes entières.

Pour la gynogénèse, la seule publication (BEASLEY et TING, 1974) concerne l'effet de diverses phytohormones sur la croissance *in vitro* de la fibre d'ovules non fécondés du cotonnier. Mais, désormais, il est possible de profiter des acquis de la culture d'ovules fécondés, qui ont permis de préciser les besoins nutritifs et hormonaux de l'embryon au cours de son développement. Les essais de gynogénèse rapportés ici ont donc été tentés dans le cadre plus vaste d'une étude sur la culture *in vitro* d'ovules de plusieurs espèces de *Gossypium* (PALLARES, 1984).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel végétal

Il est constitué de deux cultivars de *G. hirsutum* (Cv Pavlikeni et Cv Strumica) dont les graines ont été fournies par la banque de génotypes de l'I.R.C.T. Les plantes sont élevées en serre régulée en veillant à les maintenir dans des conditions physiologiques et phytosanitaires optimales, afin d'éviter l'influence néfaste d'un mauvais état des plantes mères sur la culture *in vitro* ultérieure.

Les fleurs sont soit prélevées la veille de l'anthèse, soit émasculées à cette date, les parties femelles étant protégées d'une pollinisation accidentelle jus-

qu'au prélèvement de l'ovaire qui intervient dans les deux jours (anthèse ou lendemain de l'anthèse).

Ces trois stades de prélèvement ont donné des résultats équivalents, mais aucune analyse statistique rigoureuse n'a été réalisée à ce sujet.

Méthode

La stérilisation des capsules est effectuée, après lavage avec un détergent et rinçage, par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 8 % pendant 20 minutes, suivie de 3 rinçages à l'eau stérile. Il peut s'avérer nécessaire d'effectuer ensuite un

trempage dans l'alcool à 95° et un flambage rapide juste avant l'ouverture des capsules et l'excision des ovules.

Ces derniers sont ensemencés sur le milieu de culture, donné en annexe, préalablement coulé en boîtes de pétri et solidifié à l'agar. Les boîtes, hermé-

tiquement bouchées au « cellofrans », sont transférées en salle de culture à 27°C \pm 1 où elles restent de 2 à 3 mois dans le noir absolu.

Aucun repiquage n'est effectué pendant le déroulement de la culture.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les ovules non fécondés produisent peu de fibre mais un cal, dont l'aspect et le volume varient en fonction de l'orientation des ovules sur le milieu, se développe à partir de leurs téguments externes. Lorsque les ovules sont déposés verticalement sur le milieu, le cal les englobe totalement et systématiquement; il a été ultérieurement constaté une dégénérescence complète de l'ovule; par contre, cette position semble favorable à une organogenèse somatique. C'est l'inverse qui se produit lorsque les ovules sont couchés et, dans ce cas, des structures proembryonnaires ont été observées. Après deux mois de culture, deux types de formations sont visibles :

Formations observées dans la cavité ovulaire

Leur morphologie externe peut aller du nodule au véritable embryon dicotylédonaire, tandis que leur structure interne se révèle très voisine de celle d'un embryon zygotique au cours de sa maturation: les nodules (proembryons globulaires) évoluent vers les stades cordiforme, puis dicotylédonaire, tandis que se différencient provascularisation, méristèmes caulinaire, racinaire, cotylédonaire et même des glandes à gossypol (fig. 1, 2 et 3).

Ces formations, dont on ne voit qu'un exemplaire par ovule et qui sont maintenues au niveau du micropyle par un suspenseur, seront considérées comme des proembryons et des embryons, car supposées provenir de la division des cellules haploïdes (cosphère ou synergides) du sac embryonnaire. Des

écrasements dans le carmin acétotannique ont été tentés, en vue d'un dénombrement chromosomique, mais l'abondance de réserves sous forme de grains d'amidon a empêché toute détermination de leur niveau de ploïdie. Il conviendra donc de vérifier cette hypothèse par comptage sur pointes de racines, si l'on obtient la germination et le développement en plantules de ces embryons.

Méristèmes et néoformations dans le cal

Dans le même temps et sur le même milieu de culture, on peut observer au sein du cal l'initiation de méristèmes, le plus souvent à proximité immédiate d'un repli du cal, au milieu d'un tissu riche en amidon, en trachéides et en glandes à gossypol. Une première étape de différenciation cellulaire entraîne la mise en place d'un pseudoépiderme limitant le dôme méristématique dont la convexité fait face à une lumière (fig. 4). Certaines cellules de cette assise se divisent pour donner naissance à des diverticules qui se détachent par la suite et se retrouvent libres dans cette cavité, sous forme de petits nodules de 4 à 12 cellules (fig. 5).

Il pourrait ici s'agir de stades précoces d'embryogenèse somatique, laquelle a été récemment décrite chez le genre *Gossypium* par PRICE et SMITH (1980), DAVIDONIS et HAMILTON (1983), FINER et SMITH (1984). La néoformation visible sur la figure 6, et apparue à la périphérie d'un cal, pourrait être un stade plus avancé. La partie caulinaire est parfaitement orga-

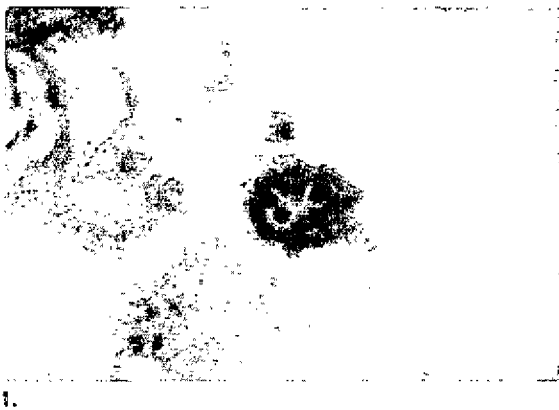
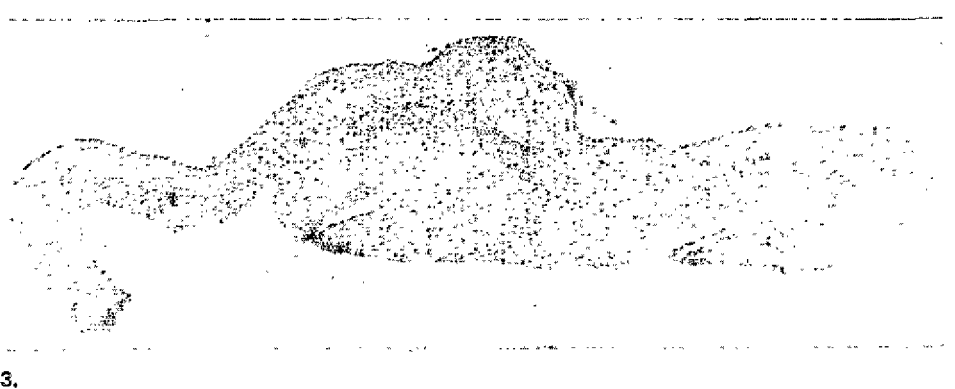


Fig. 1. — Nodule pluricellulaire au niveau du micropyle d'un ovule non fécondé de *G. hirsutum*, après 2 mois de culture. Coupe longitudinale de l'ovule. \times 240.



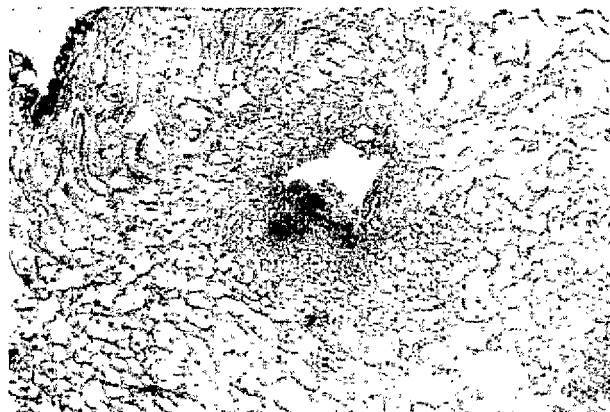
Fig. 2. — Proembryon à structure interne élaborée (une partie a été coupée pour dénombrement chromosomique). Coupe longitudinale d'ovule non fécondé de *G. hirsutum* après 2 mois de culture. \times 60.

Fig. 3. — Coupe transversale d'embryon extrait d'ovule non fécondé de *G. hirsutum* après 3 mois de culture. \times 40. Noter le développement des cotylédons.



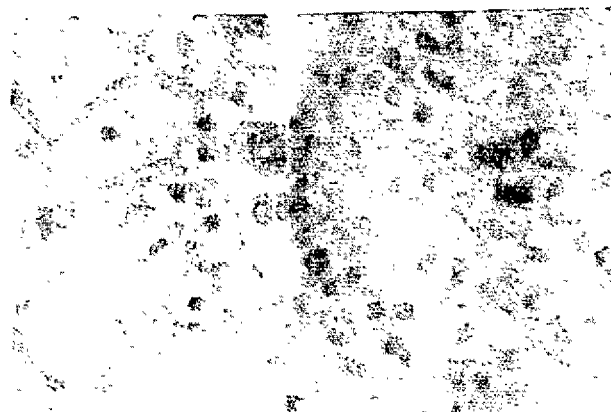
nisée, avec un méristème apical et des ébauches foliaires. Le procambium s'étend vers un pôle racinaire plus flou encore attachant au cal. Toutefois, la présence de zones méristématiques contiguës autorise à penser que les mécanismes à l'origine de cette néo-

formation peuvent être une succession de processus organogènes (différentiation caulinaire, puis racinaire) différant d'un processus embryogène unique. L'observation de stades intermédiaires pourrait lever l'ambiguïté sur ce point.



4.

FIG. 4. — Meristème dans le cal issu d'ovule non fécondé après 2 mois de culture. Noter la présence des nodules pluricellulaires dans la lumière. $\times 30$.



5.

FIG. 5. — Formation d'un diverticule épidermique par le meristème. $\times 250$.



FIG. 6. — Coupe longitudinale de néoformation sur cal issu d'ovule non fécondé de *G. hirsutum* après 3 mois de culture. Détails : meristème caulinaire, ébauches foliaires, épiderme, provascularisation faisant la jonction avec le pôle racinaire. $\times 150$.

6.

CONCLUSION

Ces observations des ovules non fécondés de cotonniers cultivés *in vitro* font apparaître une activité certaine qu'il serait intéressant d'étudier plus avant.

L'influence de l'orientation des ovules par rapport au milieu laisse supposer une polarisation dans le transport des éléments nutritifs et des substances de croissance. Rechercher la meilleure position pour les ovules accroîtra les chances de succès.

La gynogenèse permettrait, par l'obtention rapide d'haploïdes de n'importe quelle espèce de cotonnier, de préciser certains aspects de l'hérédité de caractères chez le genre *Gossypium*. Ces haploïdes, une fois doublés, autoriseraient le diagnostic précoce de la valeur d'un croisement. Il convient toutefois de

s'assurer du niveau de ploïdie des embryons rencontrés dans les cavités ovulaires.

Les tissus diploïdes de l'ovule semblent, quant à eux, être un matériel de choix pour la multiplication végétative par organogenèse et/ou embryogenèse somatique. Les résultats décrits ici ayant été obtenus après seulement 2 à 3 mois de culture, sont encourageants dans l'optique de cette dernière voie, les autres tissus somatiques du cotonnier semblant, d'après la littérature, passer par un stade de callogenèse beaucoup plus long (de l'ordre d'un à deux ans).

Il reste cependant à induire la formation de structures de ce type en plus grand nombre, afin d'en envisager le repiquage sur des milieux favorisant leur développement en plantules.

BIBLIOGRAPHIE

- BARROW, J.; KATTERMAN, F.; WILLIAMS, D., 1978. — Haploid callus from cotton anther. *Crop Sci.*, 18, 619-622.
- BEASLEY, C.A., 1971. — *In vitro* culture of fertilized cotton ovules. *Bioscience*, 21, 906-907.
- BEASLEY, C.A.; TING, I.P., 1973. — The effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from fertilized cotton ovules. *Amer. J. Bot.*, 60, 130-139.
- BEASLEY, C.A.; TING, I.P., 1974. — The effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from unfertilized cotton ovules. *Amer. J. Bot.*, 61, 188-194.
- BEASLEY, C.A.; TING, I.P.; LINKINS, A.E.; BIRNBAUM, E.M.; DELMER, D.P., 1974. — Cotton ovule culture: A review of progress and a preview of potential. In: *Tissue Culture and Plant Sci.*, Academic Press, London, 169-192.
- DAVIDONIS, G.H.; HAMILTON, R.H., 1983. — Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci. Letters*, 32, 89-93.
- EID, A.A.H.; DE LANGHE, E.; WATERKEYN, L., 1973. — *In vitro* culture of fertilized cotton ovules. I: The growth of cotton embryos. In: *La Cellule*, 69, 361-371.
- FINER, J.J.; SMITH, R.H., 1982. — Isolation and culture of protoplasts from cotton (*G. klotzschianum* Anderss.) callus cultures. *Plant Sci. Letters*, 26, 147-151.
- FINER, J.J.; SMITH, R.H., 1984. — Initiation of callus and somatic embryos from explants of mature cotton (*G. klotzschianum* Anderss.). *Plant Cell Reports*, 3, 41-43.
- GILL, M.S.; BAJAJ, Y.P.S., 1984 a. — *In vitro* production of interspecific hybrids in cotton. *Current Sci.*, 53, 2, 102-104.
- GILL, M.S.; BAJAJ, Y.P.S., 1984 b. — Interspecific hybridization in the genus *Gossypium* through embryo culture. *Euphytica*, 33, 305-311.
- HSI, Y.; WU, K., 1978. — Callus formation induced from the anther culture of Upland cotton (*G. hirsutum* L.). *Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Peking*, 239-241.
- HSU, C.L.; McD. STEWART, J., 1980. — Initiation of ovular callus and growth of cells in suspension of *G. arboreum* L. *USDA report*, Cott. qual. Lab. Dept Plant and Soil Sci., Univ. of Tennessee, Knoxville, Tennessee, U.S.A.
- JOSHI, P.C., 1960. — *In vitro* growth of cotton ovules. In: *Plant embryology: a symposium. Council of scientific and industrial research, New Delhi, India*. Sangam Press Ltd., 199-204.
- JOSHI, P.C.; JOHRI, B.M., 1972. — *In vitro* growth of ovules of *G. hirsutum*. *Phytomorphology*, 22, 2, 195-209.
- KATTERMAN, F.R.H.; WILLIAMS, M.D.; CLAY, W.F., 1977. — The influence of a strong reducing agent upon the initiation of callus from the germinating seedlings of *G. barbadense*. *Physiol. Plant.*, 40, 98-100.
- PALLARES, P., 1984. — Culture *in vitro* d'ovules fécondés et non fécondés de cotonnier. *Mémoire D.E.S., U.S.T.L., Montpellier, France*.
- PRICE, H.J.; SMITH, R.H.; GRUMBLES, R.M., 1977. — Callus cultures of six species of cotton (*Gossypium* L.) on defined media. *Plant Sci. Letters*, 10, 115-119.
- PRICE, H.J.; SMITH, R.H., 1980. — Somatic embryogenesis from *Gossypium* suspension cultures. *Planta*, 145, 305-310.
- SMITH, R.H.; PRICE, H.J., 1979. — Meristematic areas in *Gossypium* callus. *Abstract of Res. Report, Texas A & M Univ., Dept of Plant Sci., College Station, Texas, U.S.A.*
- STEWART, J. McD.; HSU, C.L., 1977. — *In ovulo* embryo culture and seedling development of cotton (*G. hirsutum* L.). *Planta*, 137, 113-117.
- STEWART, J. McD.; HSU, C.L., 1978. — Hybridization of diploid and tetraploid cotton through *in ovulo* embryo culture. *J. Hered.*, 69, 404-408.
- WILLIAMS, M.D., 1978. — Conditions for optimal growth and differentiation of *G. hirsutum* L. tissue cultures. *Abstract of Ph. D., Univ. of Arizona*.

ANNEXE

Milieu utilisé pour la culture d'ovules non fécondés

Macroéléments :

	mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	136,99	1
KNO ₃	1 011,10	10
NH ₄ NO ₃	600,00	7,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	246,48	1
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220,53	1,5

Microéléments [selon MURASHIGE et SKOOG (1932)]	mg.l ⁻¹	µM.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 4H ₂ O	8,6	36
H ₂ BO ₃	6,2	100
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	130
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,1
I - K	0,83	5
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,025	1
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,1
Solution de fer	mg.l ⁻¹	µM.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,3	107,07
FeSO ₄ . 4H ₂ O	27,8	100

Acide ascorbique 100 mg.l⁻¹

Vitamines de MOREL (1948) :

Panthoténate de calcium	: 1 mg.l ⁻¹
Meso-inositol	: 100 mg.l ⁻¹ (+ 200 mg.l ⁻¹)
Acide nicotinique	: 1 mg.l ⁻¹
Thiamine	: 1 mg.l ⁻¹
Pyridoxine	: 1 mg.l ⁻¹
Biotine	: 0,01 mg.l ⁻¹

Autres constituants :

Acide indole acétique	: 1 mg.l ⁻¹
Acide gibbéréllique	: 2 mg.l ⁻¹
Saccharose	: 20 g.l ⁻¹
Glucose	: 20 g.l ⁻¹
+ Bacto Agar	: 3,5 g.l ⁻¹

pH ajusté à 5 avant l'autoclavage.

First results from "in vitro" culture of unfertilized cotton ovules (*Gossypium hirsutum* L.)

P. Pallares

Laboratoire de Cytogénétique du C.I.R.A.D., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

SUMMARY

Gynogenesis haploidization of the cultivated tetraploid cotton species *G. hirsutum* has been attempted. After a two to three month long culture, embryos at various stages of development have been observed in the ovular cavities.

Meristems regenerating whole plantlets appear at the same time in the callus produced by the ovule external integuments.

KEY WORDS : in vitro culture, *Gossypium hirsutum*, ovules, gynogenesis, somatic embryogenesis.

INTRODUCTION

The genus *Gossypium* includes 33 diploid species ($2n = 2x = 26$ chromosomes) distributed into 7 genomes, from A to G, and 4 tetraploid species ($2n = 4x = 52$ chromosomes) resulting from the hybridization of two species of the A and D genomes, followed by the spontaneous doubling of the chromosomal set of the hybrid. Among the only four cultivated species of the genus, 2 are diploid and 2 are tetraploid. Hybrids between wild diploid and cultivated tetraploid species are useful to introduce improved agronomic and quality traits into commercial cottons. However, interspecific hybridization often fails, due to genetic distance between the involved genomes which affects chromosome pairing or because of possible other incompatibility factors between embryo, endosperm and maternal tissues resulting in early fruit abscission. Numerous authors have therefore attempted to overcome these obstacles by means of *in vitro* ovule or embryo culture, thus removing them from an adverse environment. They first succeeded in simple cases of self-fertilization (JOSHI, 1960; BEASLEY, 1971; JOSHI and JOSHI, 1972; EID *et al.*, 1973; BEASLEY and TING, 1973-1974; STEWART and HSU, 1977). More recently, they extended their research to more complex cases of interspecific hybridization (STEWART and HSU, 1978; GILL and BAJAJ, 1984 a and b).

In the meantime, investigations were also conducted in other fields, such as somatic embryogenesis (KATZERMAN *et al.*, 1977; PRICE *et al.*, 1977; WILLIAMS, 1978;

SMITH and PRICE, 1979; HSU and STEWART, 1980; PRICE and SMITH, 1980; FINER and SMITH, 1982, 1984; DAVIDONIS and HAMILTON, 1983) or haploidization through androgenesis (BARROW *et al.*, 1978; HSI and WE, 1978) or gynogenesis, the latter having not been reviewed in any published paper yet.

These techniques remain to be developed to be incorporated in the improvement schemes where they could be helpful and time-saving to obtain greater number of fixed homozygous lines after chromosome doubling of the haploid plants. Up to now, the androgenesis method has been the most investigated, maybe because one anther contains a larger number of potential embryos (theoretically one per microspore) and presents therefore more chances of success and variability. However, regeneration of whole plants has not been reported yet.

Regarding gynogenesis, the only published paper we know deals with the effects of various growth substances on *in vitro* fiber development from unfertilized cotton ovules (BEASLEY and TING, 1974); but the results now obtained from fertilized ovule culture, pinpointing the nutritive and hormonal requirements of the embryo, are a useful basis for gynogenesis attempts.

Those described here are part of a wider study on *in vitro* ovule culture from several *Gossypium* species (PALLARES, 1984).

MATERIALS AND METHOD

Materials

Two cultivars of *G. hirsutum* (cv Pavlikeni and cv Strumica) have been used. We wish to thank the I.R.C.T. gene bank for having provided the seeds. The plants were grown in a conditioned greenhouse, taking care of keeping them in optimal physiological and sanitary conditions as the health of the mother plants is critical for the ulterior *in vitro* culture. The flower were either harvested or emasculated the day before anthesis, the female parts being in this case protected from accidental pollination until the ovary is taken within the 2 following days (anthesis or the day after). These three collecting stages gave

identical results (but no rigorous statistical analysis has been made).

Method

After a quick wash with a detergent and rinse, the bolls were surface-sterilized either with an 8% calcium hypochlorite aqueous solution (20 minutes), then rinsed 3 times with sterile water or by dipping them in ethanol and flaming them just before the ovules are aseptically removed. It was sometimes necessary to do both treatments one after another. The ovules were then placed on the surface of the agar-solidified culture medium (see annex) previously

poured into Pétri dishes. After hermetical sealing with "cellofrats", the dishes were transferred into a growth chamber at $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ in the dark. The

ovules remained on the same medium during the 2 to 3 month lasting culture.

RESULTS AND DISCUSSION

Unfertilized ovules produced few fiber but a callus developed from their external integuments. Its appearance and volume varied with the ovule position on the medium: when the ovules were deposited vertically, they were totally enclosed by the callus and a subsequent degeneration of the ovules was systematically observed later on. When they lay horizontally, both ovule and callus continued to develop and proembryonic structures were observed in the ovular cavities.

Nevertheless, the first (vertical) position seems to be more favourable to somatic embryogenesis.

Within 2 months, two types of formations can be seen:

Formations in the ovular cavity

Their external morphology ranges from nodular to dicotyledonary embryo while their internal structure is very similar to that of a zygotic embryo at the corresponding stage of development: the nodules (globular proembryos) reach the heart, torpedo and then dicotyledonary stages while their provascularization and shoot, root and cotyledonary meristems are differentiated. Even gossypol glands can be seen (fig. 1, 2 and 3).

These formations being unique (only one per ovule) and maintained near the micropyle by a suspensor are supposed to be haploid proembryos and embryos derived from the haploid cells of the embryo sac (cosphere and synergids). Chromosome counting has been attempted through squashes in acetoferric carmine but failed due to the abundance of starch grains in the cells. As we did not let any of these

embryos reach full maturity and germination, we did not try counting on root tips which is a more efficient method. So, the hypothesis about their origin remains to be checked through the determination of their ploidy level.

Meristems, adventitious buds and somatic embryos in the callus

On the same culture medium and here again within a 3 month long culture, meristems were observed inside the callus, most often close to one of its numerous folds, among cells with a high starch content, tracheids and gossypol glands. The first step in cell differentiation is the settlement of an epidermoid layer limiting the meristematic dome, the convex side of which faces a cavity (fig. 4). From this layer, some dividing cells give rise to diverticula which become free in the cavity in the form of 4 to 12 cell small nodules (fig. 5). This could be early stages of somatic embryogenesis which has recently been described in the genus *Gossypium* by PRICE and SMITH (1936), DAVIDONIS and HAMILTON (1933) and FINER and SMITH (1984). The neoformation shown on figure 6 appeared on the periphery of a callus and could be a more advanced stage of somatic embryogenesis.

The cauline part is perfectly organized, with an apical meristem and leaf primordia. Procambium extends to the root (less distinct for it is still tied to the callus). However, the presence of contiguous meristematic areas does not make it possible to determine precisely whether this formation is a somatic embryo or an adventitious bud. In other words, it cannot be determined whether it has been

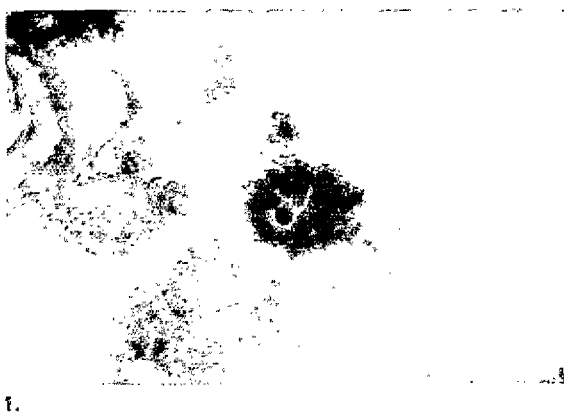


FIG. 1. — Pluricellular nodule near the micropyle of an unfertilized ovule of *G. hirsutum*, after a 2 month long culture. Longitudinal section of the ovule. $\times 240$.

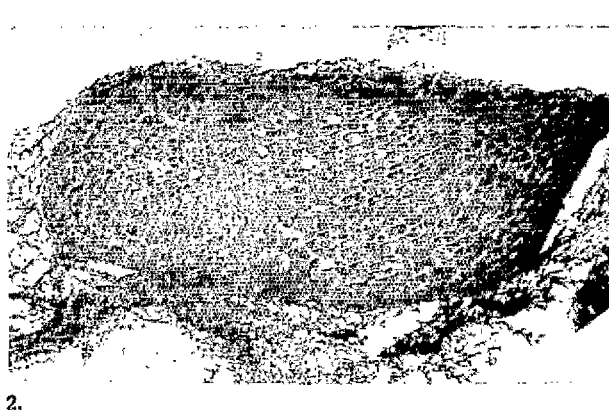
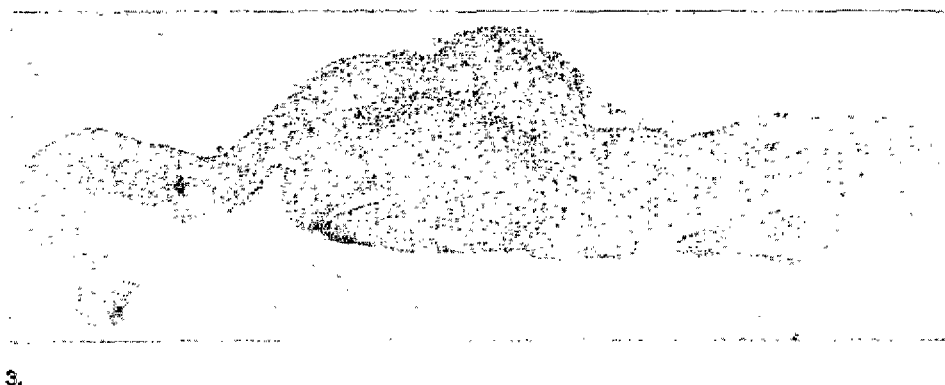


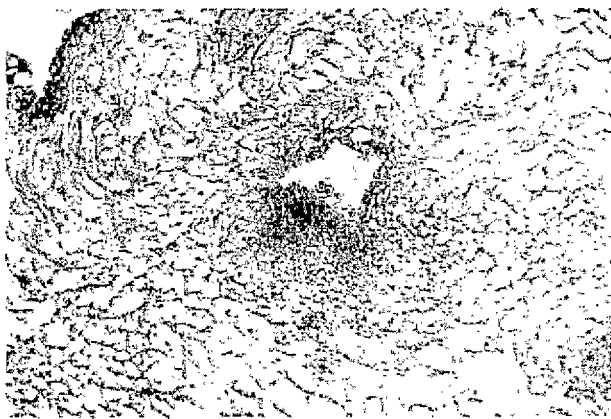
FIG. 2. — Proembryo with an elaborate internal structure (a part has been cut off for chromosome counting purposes). Longitudinal section of an unfertilized ovule of *G. hirsutum* after a 2 month long culture. $\times 60$.

FIG. 3. — Cross section of an embryo extracted from an unfertilized ovule of *G. hirsutum* after a 3 month long culture. $\times 40$. Note the cotyledon development.



generated all at once in a sole embryogenic process or by successive steps of organogenesis (first shoot then root differentiation). Only the observation of

intermediary stages of development could clear this point up.



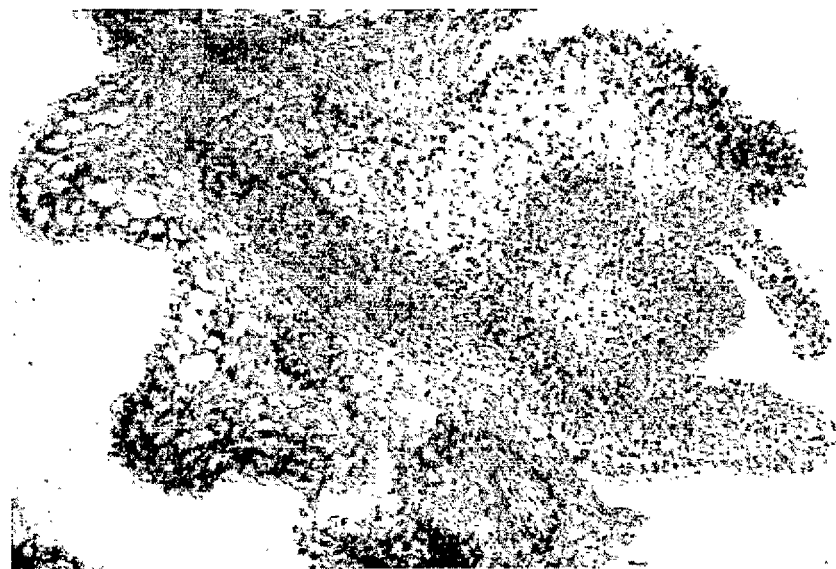
4.

FIG. 4. — Meristem in the callus produced by an unfertilized ovule after a 2 month long culture. Notice the presence of pluricellular nodules in the cavity. $\times 30$.



5.

FIG. 5. — Formation of an epidermic diverticulum by the meristem. $\times 250$.



6.

FIG. 6. — Longitudinal section of a neoformation on a callus produced by an unfertilized ovule of *G. hirsutum* after a 3 month long culture. Details: shoot apex meristem, leaf primordia, epidermis, provascularization linking up with root pole. $\times 150$.

CONCLUSION

These observations on *in vitro* culture of unfertilized cotton ovules prove their great activity which would be interesting to investigate further. The effect of the ovule position on the medium tends to indicate that a polarization exists in the transport of nutrients and growth substances. Seeking the best ovule position will certainly increase the chances of success.

If permitting to obtain haploid plants quickly from any cotton species, gynogenesis would be helpful to study character inheritance in the genus *Gossypium*. Once doubled, these haploids would allow to diagnose early the value of a cross. It remains, however,

necessary to check the ploidy level of the embryos found in ovular cavities.

The ovule diploid tissues seem extremely convenient for vegetative multiplication (either organogenesis or somatic embryogenesis). Our results have been obtained after only a two to three month long culture and they are encouraging since the other somatic tissues of cotton appear, according to the literature, less reactive. The callogenesis stage before any regeneration often reaches one year or two.

However, media remain to be found to increase the rate of formation of embryoids and lead to their development into plantlets.

RESUMEN

Ha sido intentada la haploidización por ginogénesis de la especie tetraploide cultivada de algodónero *G. hirsutum*. Después de 2 a 3 meses de cultivo, embriones en diferentes fases de desarrollo han sido observados en las cavidades ovulares. Meristemas regenerando plantones enteros aparecen al mismo tiempo en el callo producido por los tegumentos externos del óvulo.

ANNEXE

Medium used for the culture of unfertilized ovules

Macronutrients :

	mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	136.09	1
KNO ₃	1 011.10	10
NH ₄ NO ₃	600.00	7.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	246.48	1
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220.53	1.5

Micronutrients [according to MURASHIGE and SKOOG (1962)]	mg.l ⁻¹	µM.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 4H ₂ O	8.8	33
H ₃ BO ₃	6.2	100
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	130
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.1
I K	0.83	5
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.025	1
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.1
Iron solution	mg.l ⁻¹	µM.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37.3	107.07
FeSO ₄ . 4H ₂ O	27.8	100

Ascorbic acid 100 mg.l⁻¹

Vitamins according to MOREL (1948) :

Calcium panthotenate	: 1 mg.l ⁻¹
Meso-inositol	: 100 mg.l ⁻¹ (+ 200 mg.l ⁻¹)
Nicotinic acid	: 1 mg.l ⁻¹
Thiamine	: 1 mg.l ⁻¹
Pyridoxine	: 1 mg.l ⁻¹
Biotine	: 0.01 mg.l ⁻¹

Other components :

Indole acetic acid	: 1 mg.l ⁻¹
Gibberellic acid	: 2 mg.l ⁻¹
Sucrose	: 20 g.l ⁻¹
Glucose	: 20 g.l ⁻¹
+ Bacto Agar	: 5.3 g.l ⁻¹

pH adjusted to 5 prior to autoclaving.